



TITLE:

絨毛癌に対するtargeting cancer chemotherapyに関する基礎的研究 — Liposomeの応用 —

AUTHOR(S):

田寺, 成範; 山中, 望; 守殿, 貞夫

CITATION:

田寺, 成範 ...[et al]. 絨毛癌に対するtargeting cancer chemotherapyに関する基礎的研究 — Liposomeの応用 -. 泌尿器科紀要 1989, 35(2): 209-215

ISSUE DATE:

1989-02

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/116445>

RIGHT:

絨毛癌に対するtargeting cancer chemotherapy に関する基礎的研究

—Liposome の応用—

神戸大学医学部泌尿器科学教室 (主任 : 守殿貞夫教授)

田寺 成範, 山中 望, 守殿 貞夫

FUNDAMENTAL STUDIES OF TARGETING CANCER CHEMOTHERAPY AGAINST CHORIOCARCINOMA

—APPLICATION OF LIPOSOME—

Shigenori TADERA, Nozomu YAMANAKA and Sadao KAMIDONO

From the Department of Urology, Kobe University School of Medicine

For the fundamental study of the targeting cancer chemotherapy against choriocarcinoma using the anti-human chorionic gonadotropin beta subunit (hCG β) antibody-conjugated-liposome containing anticancer drugs, we evaluated the specific accumulation of the antibody to the choriocarcinoma tissue and the uptake of liposome by choriocarcinoma cells.

In vivo, the mice bearing human choriocarcinoma were injected anti-hCG β antibody (30 μ g/body) and the localization of the antibody in the tumor and other mouse organs were investigated by the PAP method. The antibody specifically accumulated to the choriocarcinoma tissue within 4 hours after the injection of the antibody, and gradually increased.

In vitro, cultured BeWo cells were exposed to the liposome containing adriamycin, the antibody conjugated liposome containing adriamycin or the adriamycin alone, respectively, for 2 hours. Then the uptake of the adriamycin by the tumor cells was studied under fluorescent microscopy. The nuclear accumulation of adriamycin was clearly observed in the tumor cells exposed to the liposome containing adriamycin or the antibody conjugated liposome containing adriamycin, whereas only faint cytoplasmic accumulation of the adriamycin without any nuclear accumulation was observed in the cells exposed to the adriamycin alone.

These results indicate that the liposome is a good carrier of anticancer drugs for immunotargeting chemotherapy.

(Acta Urol. Jpn. 35: 209-215, 1989)

Key words: Choriocarcinoma, Targeting cancer chemotherapy, Liposome

緒 言

癌関連抗原に対する抗体の臨床応用は癌研究の大きなテーマの一つであり,すでに臨床の場において診断および治療に必要不可欠なものも少なくない。

ラジオアイソトープ標識抗体によって癌の局在を診断する radioimmunodetection は, Pressman ら¹⁾ がラットリンパ肉腫に対する ¹³¹I 標識抗体が腫瘍に集積することを証明したことに始まり, それ以降 alphafetoprotein あるいは carcinoembryonic antigen などの分泌型抗原に対する抗体を用いた腫瘍画像

診断の臨床応用に関する研究がみられる^{2,3)}。ヒト絨毛性ゴナドトロピン (以下 hCG) についてもその抗体を応用した絨毛癌病巣に対する radioimmunodetection の報告⁴⁻⁶⁾があり, 山中⁷⁾は hCG のホルモン特異性が存在する β -subunit (以下 hCG β) に対する ¹³¹I 標識抗体を用いて明瞭な腫瘍イメージングに成功している。このことは, 従来困難であった精巣腫瘍の後腹膜腔や縦隔洞のリンパ節転移巣発見への本法の臨床的応用への期待を抱かせるものである。

一方, 治療への応用としてはヒト癌細胞に特異的に反応する抗体により, 癌細胞を選択的に破壊させよう

とするいわゆる特異的免疫療法の試みがなされている。そのような方法としては抗体単独による治療と、抗体と他の抗腫瘍性物質を結合させ、抗腫瘍性物質を抗体の腫瘍特異性を利用して腫瘍細胞に選択的に到達させようとする *targeting cancer chemotherapy* とがある。抗体単独での治療は臨床応用の報告も散見され、Nadler ら⁸⁾および Miller ら⁹⁾は悪性リンパ腫に対して、Rits ら¹⁰⁾は白血病に対して有効であったと報告している。これらはいずれも血液系腫瘍であるが固形癌についても大腸癌¹¹⁾、メラノーマ¹²⁾、乳癌¹³⁾などでの検討が始められている。われわれ¹⁴⁾も、*in vitro*において抗 hCG 抗体が、培養絨毛癌細胞に対して補体依存性細胞障害を発揮することを明らかにした。

Targeting cancer chemotherapy への応用は、当初 Dextran 架橋法¹⁵⁾などの抗体と抗腫瘍剤との化学的結合による方法が用いられていたが、薬剤の抗腫瘍活性が低下したり抗体に結合できる薬剤の数が少ないことなどの欠点が指摘された¹⁶⁾。現在最も多く用いられている方法は、人工脂質膜小胞である *liposome*¹⁷⁾に化学的修飾なく抗腫瘍剤を封入し *liposome* と抗体とを結合させることにより選択的抗腫瘍効果を発揮させようとする方法である。今回われわれは hCG 産生腫瘍に対しこの *liposome* を導入した *targeting cancer chemotherapy* を計画した。ここではその基礎的研究として、抗 hCG β 抗体の絨毛癌組織への特異的集積態度を絨毛癌移植ヌードマウスをモデルとして酵素抗体法を用いて組織学的に検討するとともに、アドリアマイシン（以下 ADM）を封入した *liposome* の絨毛癌細胞への移入現象を ADM 蛍光の推移により検討した。

実験方法

1. 抗 HCG β 抗体の精製

生物活性 11,000 IU/mg を有する精製 hCG¹⁸⁾ を 8 M 塩酸グアニジン処理により分離して得た β sub-unit を抗原として、家兎を用いてその抗血清を作製した。得られた抗 hCG β 抗血清を硫酸塩析にて IgG 分画を採取した後、hCG を結合させた Sepharose 4B を支持体としたイムノアフィニティカラムに添加して hCG 特異的 IgG とし、以下の実験に供した。

2. 絨毛癌移植ヌードマウスの作製および抗体の投与方法

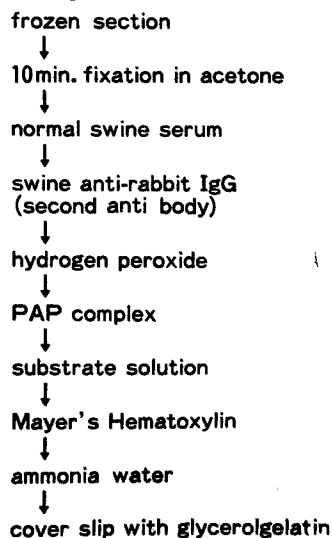
SPF (specific pathogen free) 下で飼育した BALB/c 系ヌードマウス (5~6 週齢、雄) の背部皮下に、hCG 産生絨毛癌株である BeWo¹⁹⁾ 1×10^9

個/ml (PBS) の細胞浮遊液 0.1 ml を移植し絨毛癌-ヌードマウスモデルの初代とした。腫瘍が小指頭大となった時点で摘出し他のヌードマウスに移植針を用いて順次継代した。継代後腫瘍が小指頭大となった時点で抗 hCG β 抗体を 30 μ g/body 腹腔内に投与した。同様に normal rabbit IgG (Miles Laboratories Inc.) を 30 μ g/body 投与し対照群とした。抗体又は normal rabbit IgG 投与後 4 時間、2 日、5 日後に腫瘍および他の諸臓器を摘出し、PBS にて洗浄後ただちに凍結した。

3. PAP 法による染色

凍結した組織を 10 μ m の切片とした後アセトンにて 10 分間固定し、Immunoperoxidase Staining Kit (DAKO PAP KIT, System 548, Rabbit) を用いて Table 1 に示した手順²⁰⁾ で染色した。すなわち normal swine serum にて IgFc receptor をブロッキングした後、二次抗体である antirabbit IgG を添加した。内因性ペルオキシダーゼの活性を抑えるために行う H₂O₂ 処理は IgG の抗原性を失活させやすいため二次抗体添加後に行い、以下通常の手順²¹⁾に従って染色した。一般的な PAP 法では組織内の hCG 局在を検索することが可能であるが、本実験系では *in vivo* において投与した抗体の局在を検索することを目的としている。すなわち、一次抗体としてヌードマウスの腹腔内にすでに抗 hCG β rabbit IgG を投与しており、染色時には一次抗体との反応は行わず二次抗体である swine antirabbit IgG との反応とした。その結果、腹腔内投与により抗 hCG β 抗体

Table 1. Immunoperoxidase staining procedure



が存在する部位にのみ diaminobenzidine の褐色沈着として染色される。また対照として、凍結切片を10%ホルマリンにて10分間固定し、同様の染色手順で染色し比較した。

4. ADM 封入抗体結合 liposome の作製

(1) MBPE (N-(m-maleimidobenzoil) dipalmitoylphosphatidylethanolamine) の作製

Hashimoto ら¹⁷⁾の方法に順じて作製した。すなわち MBS (m-maleimidobenzoil-N-hydroxysuccinimide ester, Pierce Chemical Company) 25 μ mol と DPPE (dipalmitoylphosphatidylethanolamine, Sigma) 20 μ mol をクロロホルム・メタノール溶液(クロロホルム・メタノール比9:1) 5 ml で溶解した後、反応促進剤として triethylamine (和光純薬) 30 μ mol を加え、室温にて約4時間振盪させた。4時間の反応後 Silica Gel 60 glass plate を用いた薄層クロマトグラフィーにて MBPE の存在を確認し(MBPE は Rf 値0.62, ニンヒドリン反応陰性), メタノール 3.5 ml, 蒸留水 2 ml を加え約10分間振盪させ、しばらく静置した後最下層のクロロホルム層のみを採取した。MBPE の分離・精製は Bio-Sil HA (BIO-RAD) を用いた silica gel chromatogram にて行った。

(2) チオール化抗体の作製

Liposome と抗体の結合を S-S 結合により行うことを目的として、抗体をチオール化した。抗 hCG β 抗体 10 mg を 2.5 ml の PBS (pH 6.8) に添加し、SPDP (N-hydroxysuccinimide-3-(2-pyridyldithio) propionate, Pharmacia) のエタノール溶液(10 mM) を 0.17 ml 加えて 23°C, 30分間振盪した。これをあらかじめ 0.1 M 酢酸ナトリウム buffer (pH 4.5) で平衡化した Columus PD-10 (Sephadex G-25M, Pharmacia) に添加し、チオール化抗体の PBS 溶液を得た。

(3) ADM 封入リポソームの作製

DPPE (dipalmitoylphosphatidylcholine, Sigma) 25 μ mol, コレステロール(和光純薬) 17.5 μ mol, MBPE 2.5 μ mol を 10 ml のクロロホルムに溶解し、ロータリーエバポレータにてフラスコ内面に均質な薄層のリン脂質の膜を形成させた。このフラスコ内に PBS (pH 6.8) 5 ml に溶解した ADM 10 mg をガラスビーズとともに加え、約20分間激しく攪拌した。さらに 25°C にて約1時間 sonication した後、2.0 μ m のフィルターを通じて、ADM 封入 liposome の懸濁液を得た。

(4) 抗体結合 liposome の作製

得られた liposome の懸濁液にチオール化した抗体溶液 2 ml を加え、37°C にて約1時間振盪した。さらに PBS (pH 6.3) にて一晚透析し、非封入 ADM を除去した。

なおリン脂質の操作はすべて可能な限り窒素ガス下で行った。

(5) liposome の細胞内移入の検討

BeWo 株を 5×10^6 個/ml (PBS, pH 7.4) の細胞浮遊液とした後、ADM 封入 liposome, ADM 封入抗体結合 liposome および ADM 単独の各群での浮遊液中 ADM 含有量が 10 μ g/ml となるように添加した。2時間経過後遠沈、洗浄を3回行い蛍光顕微鏡にて観察した。

実験結果

1. 絨毛癌移植ヌードマウスについて

2代目からの BeWo 株のヌードマウスへの生着率は、本実験系においてはほぼ100%であった。腫瘍移植後約5日で腫瘍塊として測定可能となり、最初は充実に発育するものの比較的もろく、小指頭大を越えるあたりから腫瘍組織内に出血をきたし、囊腫状に急激な腫瘍体積の増大を認める場合が多かった。小指頭大までの腫瘍は表皮および筋層への浸潤は非常に稀で、摘出は比較的容易であった。腫瘍組織は H-E 染色上ほとんどが典型的な cytotrophoblast で占められ (Fig. 1), 絨毛癌モデルとして適正と判断された。

2. ヌードマウスに投与した抗体の局在について

抗 hCG β 抗体投与2日後では、抗体は絨毛癌組織において帯状に褐色の色素沈着として認められたが (Fig. 2), 肝では全体がびまん性に淡い褐色の色調として染色された (Fig. 3), normal rabbit IgG 投与では抗体投与群と同様に絨毛癌組織では帯状に染色されたが抗体投与群に比べて不明瞭であった (Fig. 4)。このような絨毛癌組織での抗体の存在はすでに投与後4時間で認められていたが (Fig. 5) 経日的に拡大傾向を示した (Fig. 6)。Fig. 2~6 に示したようにアセトン固定の場合には抗 hCG β 抗体の到達部位が褐色の色素沈着として鮮明に染色されたが、10%ホルマリンでの染色性は不良で、さらに10%ホルマリンにて2日間固定した後、パラフィン包埋による切片ではまったく染色されなかった。二次抗体との反応前に行った過酸化水素処理の場合もまったく染色されなかった。

3. liposome の培養絨毛癌細胞内移入

ADM 封入 liposome および ADM 封入抗体結合 liposome の培養絨毛癌細胞内移入の程度に蛍光顕微鏡上明らかな差はなく、両群とも ADM の発する蛍

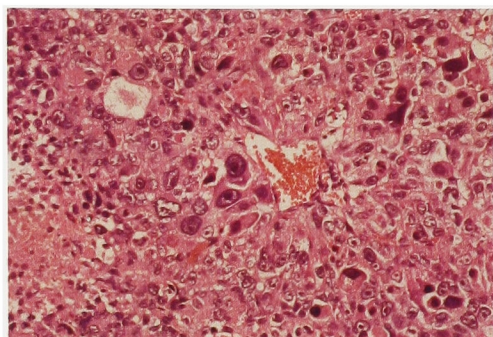


Fig. 1. H-E stain of BeWo tumor transplanted to nude mouse (×200)

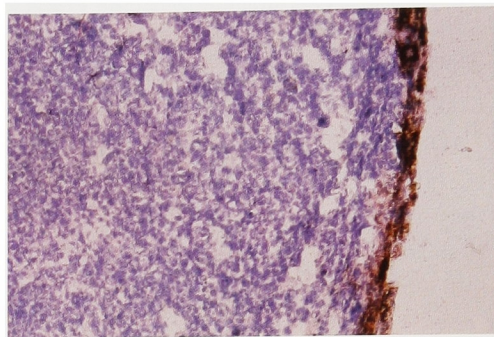


Fig. 4. PAP stain of BeWo tumor transplanted to nude mouse, ×100 (2 days after intraperitoneal injection of the normal rabbit IgG)

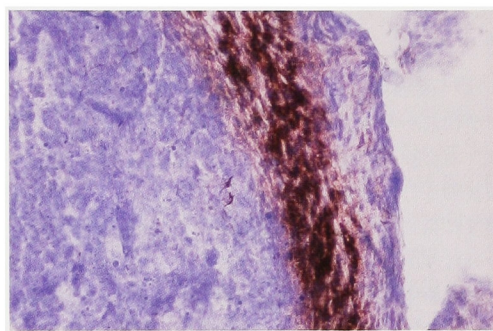


Fig. 2. PAP stain of BeWo tumor transplanted to nude mouse, ×100 (2 days after intraperitoneal injection of the anti-hCGβ rabbit IgG)

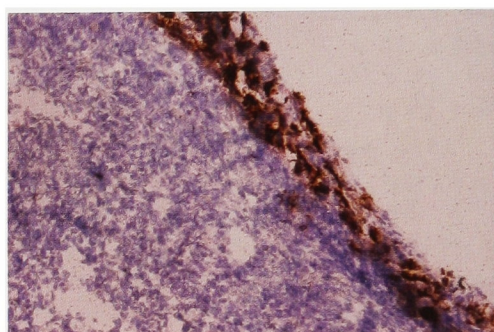


Fig. 5. PAP stain of BeWo tumor transplanted to nude mouse, ×100 (4 hours after intraperitoneal injection of the anti-hCGβ rabbit IgG)

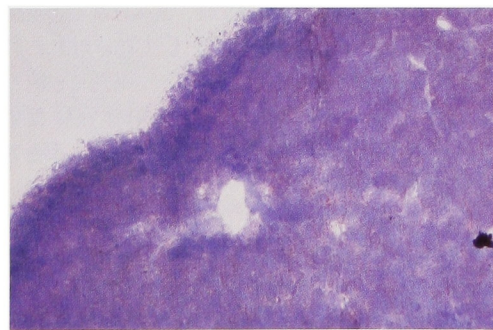


Fig. 3. PAP stain of normal liver, ×100 (2 days after intraperitoneal injection of the anti-hCGβ rabbit IgG)

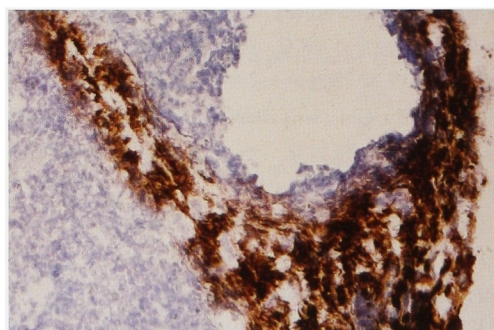


Fig. 6. PAP stain of BeWo tumor transplanted to nude mouse, ×100 (5 days after intraperitoneal injection of the anti-hCGβ rabbit IgG)

光により核が明瞭に観察されたが、細胞質での ADM の存在はほとんど認められなかった (Fig. 7 a, b). 一方, ADM 単独では ADM はほとんど細胞質に雲状に存在し、核はむしろ ADM 欠損部として観察された (Fig. 7 c).

考 察

癌に対する化学療法は現在広く普及しているが、現有の抗癌剤の最大の欠点はそれ自体に腫瘍選択性がな

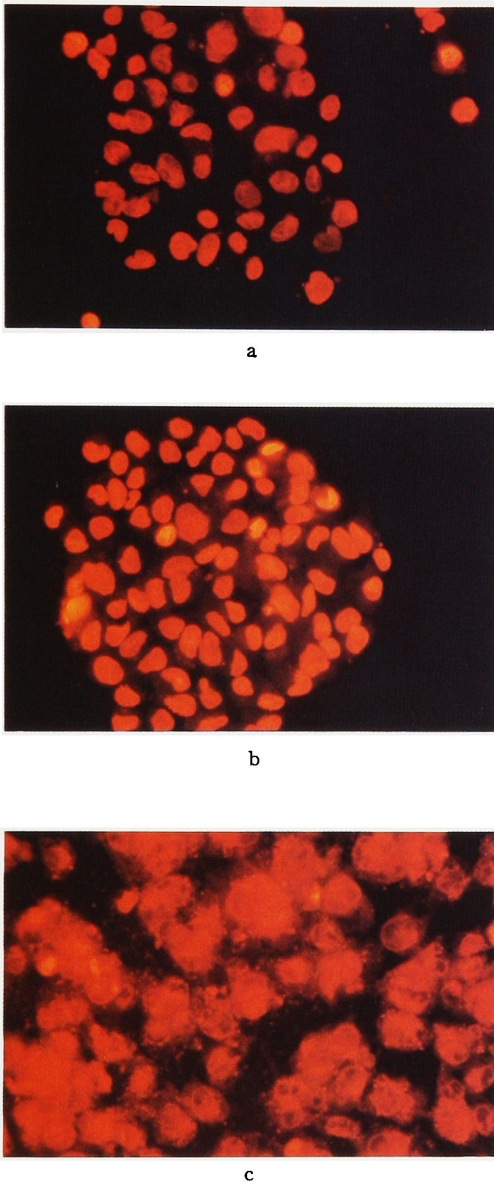


Fig. 7. Fluorescent photomicrograph of BeWo cell suspension, 2 hours after addition of ADM entrapped in liposomes (a), ADM entrapped in liposomes bearing anti-hCG β antibody (b), ADM alone (c).

く、健常組織障害による副作用が通常認められるということである。それを改善すべく局注や動注などの投与方法やマイクロカプセルなどの剤型変更により腫瘍到達性の向上が図られている。

Liposome に抗癌剤を封入しかつ抗体を結合させた複合体による化学療法は、抗体の腫瘍集積性を期待

し抗癌剤を癌組織に効率的に到達させ選択的抗腫瘍効果をあげようという試みである。生体膜は主としてリン脂質からなる二重の脂質層を骨格として形成されている。人工的にリン脂質の薄膜を作り、それを塩類溶液に懸濁するとその脂質は二重層を形成し、その中に袋状の小胞を形成する。この人工脂質膜小胞 (liposome) が形成されるさいには溶液中の物質を取り込むため、これを応用することによりさまざまな物質をその小胞中へ封入することが可能である。liposome のキャリアとして勝れている点は (1) 生体膜類似の組成のため毒性が少なく、しかも生体は自己の細胞膜を破壊するのと同様に liposome を処理しうる。 (2) 作製が容易で大量に均質なものが作れる。 (3) 化学的修飾によらない物理的封入のため薬剤活性の低下がない。 (4) 脂質膜で外界から完全に隔離されているため種々の破壊酵素や免疫機構による攻撃から免れうる。 (5) 構成する脂質を変えたり表面電荷を変えることで細胞融合能をもたせたり、貪食されやすいように性質を変えることができる。 (6) 親水性の物質はすべて liposome 内に封入可能で、疎水性のものも liposome 膜に組み込むことにより liposome をキャリアとして使用しうる。 (7) 表面に抗体を複数個結合できるので targeting cancer chemotherapy に好都合などさまざまな長所を有する²³⁾。

抗体単独での腫瘍に対する特異的免疫療法は、おもに血液幹細胞の分化型抗原に対する抗体により行われている⁸⁻¹⁰⁾。それら報告にみられる抗体投与による抗腫瘍効果はいずれも一時的な腫瘍細胞減少にとどまっており、投与後10~24時間後には投与前の値に回復ししまい、反復投与しても効果は一時的であると報告されている。その作用機序については、抗体が補体を活性化して起こる補体依存性細胞障害や、リンパ球やマクロファージなどが標的細胞と反応した抗体の Fc 部分に結合して起こる抗体依存性細胞障害 (antibody dependent cell mediated cytotoxicity, ADCC)²³⁾などが考えられている。しかし、抗体によっては全く腫瘍細胞に障害性を示さなかったり、抗原の変調 (antigenic modulation)²⁴⁾すなわち抗体投与により腫瘍細胞表面の抗原が減少、消失し抗体の追加投与が効奏しなくなるなどの問題点がある。抗原性の高いメラノーマは別としても、固形癌に対する抗体単独療法は未だ良い成績が得られておらず、その意味でいわゆる“ミサイル療法”²⁵⁾としてのより効果的な治療法の開発が期待される。

Liposome に封入された薬剤がどのような機序で細胞内に取り込まれるかという基礎的検討はまだほと

んどされていない。一般的に細胞のリセプターを介する結合はエンドサイトーシスも期待しうるが、抗原と結合した抗体-liposome がどの程度エンドサイトーシスあるいは細胞融合により細胞内に入りうるかの検討が今後必要と思われる。今回、われわれの検索では ADM 単独よりも liposome 内封入 ADM および抗体結合 liposome 内封入 ADM の方が核への取り込みは明らかに優れており、このことは ADM が DNA の合成阻害により抗腫瘍効果を発揮するという作用機序から考えて大きな期待を抱かせる。おそらく liposome は生体膜類似の構造のために細胞内へ取り込まれた後、細胞内小器官での破壊、吸収が少ないものと推察される。ADM 封入 liposome と ADM 封入抗体結合 liposome との細胞内への移入現象にはそれら抗体結合の有無による明らかな差を認めなかった。本実験系では抗体の腫瘍集積性が反映せず liposome と BeWo 細胞の接触機会が同程度であることから、ADM の細胞内への移入は抗体よりも liposome の非特異的效果への依存度が大きいことを示唆する結果と考えられる。

血中抗原の定量に抗体を利用する場合は、血中に遊離抗原が存在する必要があることは言うまでもない。しかし、抗体を用いて radioimmunoassay や targeting cancer chemotherapy を行う場合は、血中に存在する遊離抗原はいわゆる blocking antigen となり抗体を一部不活化させてしまうため、一般的に血中に遊離しない細胞表面抗原に対する抗体の方が有利であると考えられている。すなわち hCG が細胞表面に表現されているか否かという問題やまた、hCG は分泌型抗原であり血中に大量に存在し blocking antigen として働くために、抗 hCG 抗体が腫瘍組織に特異的に集積するか否かを確認する必要がある。われわれはすでに *in vitro* において抗 hCG 抗体が培養絨毛癌細胞に対して補体依存性細胞障害を発揮することを培養液中のプロゲステロン濃度を細胞活性の指標とするという独自の細胞障害試験により明らかにした¹⁴⁾。このことは分泌型糖蛋白である hCG が細胞表面にも表現されているということを示唆する結果と考えられる。また今回、酵素抗体法による染色により絨毛癌移植 ノードマウスの腹腔内に投与した抗 hCG β 抗体が明らかに腫瘍組織に特異的に集積していることが確認され、さらに山中¹⁵⁾による明瞭な tumor imaging の成功は抗 hCG β 抗体の特異的集積による結果であることから、少なくとも hCG 産生腫瘍においては血中に大量に存在する抗原が blocking antigen としてきわめて重大な問題とはならず、

抗原を絶えず血中に遊離させている腫瘍に対しての targeting cancer chemotherapy の有用性を示唆するものと考えられた。

結 語

絨毛癌に対する抗 hCG β 抗体結合抗癌剤封入 liposome による targeting cancer chemotherapy を企画し、その基礎的研究として担癌ヌードマウスの絨毛癌組織への抗体の特異的集積と liposome の培養絨毛癌細胞内移入状態を検討した。

培養絨毛癌細胞である BeWo 株を移植したヌードマウスに抗 hCG β 抗体を投与した後、腫瘍および他の諸臓器を酵素抗体法により染色しその抗体の局在を観察したところ、絨毛癌組織への特異的集積が認められた。このような特異的集積は抗体投与後 4 時間ですでに認められ、経日的に拡大傾向を示した。

BeWo 株の細胞浮遊液に ADM 封入 liposome, ADM 封入抗体結合 liposome および ADM 単独を添加し、蛍光顕微鏡で観察したところ ADM 封入 liposome および ADM 封入抗体結合 liposome では核が明瞭に観察され細胞質での ADM はほとんど認められなかった。一方、ADM 単独添加では ADM は細胞質内に雲状に存在し、核はむしろ ADM 欠損部として観察された。このことは、liposome が抗癌剤のキャリアとして勝れていることを示唆する結果と考えられた。

稿を終えるにあたり、懇親なる御指導を賜りました神戸大学名誉教授石神義次先生に深甚なる謝意を捧げます。また本研究に多大な御協力を頂きました神戸大学産婦人科学教室西村隆一郎博士ならびに同脳神経外科学教室佐谷秀行博士に厚く感謝の意を表します。

本研究は、文部省科学研究費補助金(一般研究 B, 60480358)による。また、本論文の要旨は第23回日本癌治療学会総会において報告した。

文 献

- 1) Pressman D and Pressman R: Computer programs for paired and triad radioiodine label techniques in radioimmunochemistry. *Int J Appl Radiat Isot* **18**: 617-622, 1965
- 2) Thurlow PJ and McKenzie IFC: Monoclonal antibodies in clinical medicine a review. *Aust N Z J Med* **13**: 91-100, 1983
- 3) Goldenberg DM, Preston DF, Primus J and Hansen HJ: Photocan localization of GW-39 tumors in hamsters using radiolabelled anticartinoembryonic antigen immunoglobulin G. *Cancer Res* **34**: 1-9, 1974

- 4) Begent RHJ, Searle F, Stanway G, Jewkes RF, Jones BF, Vernon P and Bagshawe KD: Radioimmunolocalization of tumors by external scintigraphy after administration of ^{131}I Antibody to human chorionic gonadotropin. *J Roy Soc Med* 73: 624-630, 1980
- 5) Goldenberg DM, Kim EE, Deland FH, Van Nagell JR and Javadpour N: Clinical radioimmunodetection of cancer with radioactive antibodies to human chorionic gonadotropin. *Science* 208: 1284-1296, 1980
- 6) Quinones J, Mizejewski G and Beierwaltes WH: Choriocarcinoma scanning using radiolabeled antibody to chorionic gonadotropin. *J Nucl Med* 12: 69-75, 1971
- 7) 山中 望: hCG 産生腫瘍の免疫学的局在診断に関する基礎的研究 — ^{131}I -anti hCG β による腫瘍イメージ。泌尿紀要 29: 601-613, 1983
- 8) Nadler LM, Stashenko P and Hardy R: Serotherapy of a patient with a monoclonal antibody directed against a human lymphoma-associated antigen. *Cancer Res* 40: 3147-3154, 1980
- 9) Miller RA, David G, Maloney BS, Warnke R and Levy R: Treatment of B-cell lymphoma with monoclonal anti-idiotypic antibody. *New Eng J Med* 306: 517-522, 1982
- 10) Rits J, Pesand JM and Sallan SE: Serotherapy of acute lymphoblastic leukemia with monoclonal antibody. *Blood* 58: 141-152, 1981
- 11) Koprowski H and Steplewski Z: Research monographs in immunology, Vol. 3. In: Monoclonal antibodies and T-cell hybridoma. Edited by Hammering GJ. pp. 161-173, Elsevier/North Holl and Biomedical Press, 1981
- 12) 谷口 克, 若林正治: モノクローナル抗腫瘍抗体—腫瘍診断と治療への応用—. 癌の臨床 29: 654-658, 1983
- 13) Schlom J, Wunderlich D and Teramoto YA: Generation of human monoclonal antibodies reactive with human mammary carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 6841-6845, 1980
- 14) 田寺成範, 山中 望, 岡田泰長, 守殿貞夫, 石神襄次, 西村隆一郎, 望月真人: 抗 hCG 精製抗体の絨毛癌に対する抗腫瘍効果. 日本癌治 20: 550-55, 1985
- 15) Bernstein A, Hurwitz E, Maron R, Arnon R, Sera M and Wilchek M: Higher antitumor efficiency of daunomycin when linked to dextran: *in vivo* and *in vitro* studies. *J Natl Cancer Inst* 60: 379-384, 1978
- 16) Hurwitz E, Levy R, Maron R, Wilchek M, Arnon R and Sera M: The covalent binding of daunomycin and adriamycin to antibodies, with retention of both drug and antibody activities. *Cancer Res* 35: 1175-1181, 1975
- 17) Hashimoto Y, Sugawara M, Masuko T and Hojo H: Antitumor effect of actinomycin D entrapped in liposomes bearing subunits of tumor-specific monoclonal immunoglobulin M antibody. *Cancer Res* 43: 5328-5334, 1983
- 18) Nishimura R, Endo K, Tanabe K, Ashtaka Y and Tojo S: The biochemical properties of urinary human chorionic gonadotropin from the patients with trophoblastic diseases. *J Endocrinol Invest* 4: 349-358, 1981
- 19) Pattillo RA and Gey GO: The establishment of a cell line of human hormone-synthesizing trophoblastic cell *in vitro*. *Cancer Res* 28: 1231-1238, 1968
- 20) Shen JW, Atkinson B, Koprowski H and Sears H: Binding of murine immunoglobulin to human tissues after immunotherapy with anticorectal carcinoma monoclonal antibody. *Int J Cancer* 33: 465-468, 1984
- 21) Sternberger LA, Hardy PH, Cuculis JJ and Meyer HG: The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase anti-horseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem* 18: 315-333, 1970
- 22) 多田隈卓史: モノクローナル抗体の将来展望—リポソームへの応用—. 細胞工学 1: 72-78, 1982
- 23) Lanier LL, Babcock GF, Raybourne RB, Arnold LW, Warner NL and Haughton G: Mechanism of B cell lymphoma immunotherapy with passive xenogenic anti-idiotypic serum. *J Immunol* 125: 1730-1736, 1980
- 24) Old LJ, Stockert E, Boyse EA and Kim JH: Antigenic modulation; loss of TL antigen from cells exposed to TL antibody. Study of the phenomenon *in vitro*. *J Exp Med* 127: 523-539, 1968
- 25) 菊池浩吉, 湯浅博夫: I. モノクローナル抗体とその応用 2. 腫瘍の診断と治療への応用 (5) イムノトキシンの癌治療への応用の可能性. 臨床化学 18: 1075-1081, 1982

(1988年8月4日迅速掲載受付)